

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-339375

(P2003-339375A)

(43)公開日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	デフォルト*(参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 0 1 N 33/53	M 4 B 0 2 9
G 0 1 N 33/53		37/00	1 0 2 4 B 0 6 3
37/00	1 0 2	C 1 2 Q 1/68	A
// C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	F
審査請求 有 請求項の数16 O L (全 8 頁)			

(21)出願番号 特願2002-150446(P2002-150446)

(22)出願日 平成14年5月24日(2002.5.24)

(71)出願人 000003108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 加藤 宏一

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

株式会社日立製作所ライフサイエンス推進

事業部内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ハイブリダイゼーション方法および装置

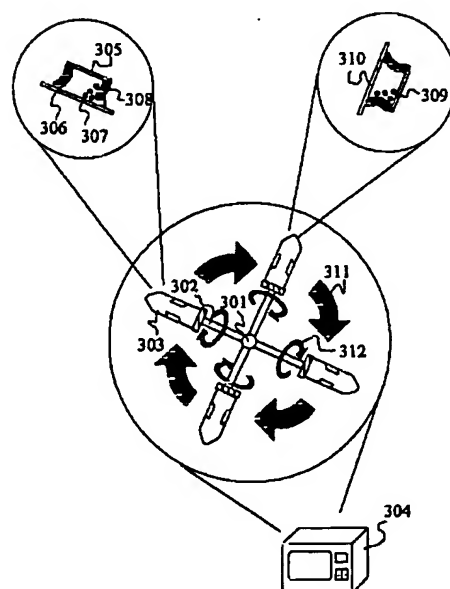
(57)【要約】

【課題】 DNAチップ計測において、基盤表面に固定されたプローブDNAに対するターゲットDNAのハイブリダイゼーション効率を向上させるハイブリダイゼーション方法および装置を提供することを目的とする。

【解決手段】 DNAチップ上において、微粒子を含んだハイブリダイゼーション溶液をカバーガラスとシール剤により密封する。DNAチップを保持したハイブリダイゼーションチャンバは回転軸を中心として回転している。微粒子は重力方向へ落下するため、ハイブリダイゼーション溶液を攪拌する効果を持つ。ハイブリダイゼーション溶液中のDNAターゲットの拡散距離が増加するため、ハイブリダイゼーションの効率が上昇する。

【効果】 DNAチップ計測におけるハイブリダイゼーションの効率を向上させ、定量性・再現性の高い信号を得ることができる。

図3



【特許請求の範囲】

【請求項1】 第1のヌクレオチドと前記第1のヌクレオチドと相補的な第2のヌクレオチドとのハイブリダイゼーション方法であって、

前記第1のヌクレオチドが固定化された基盤に対し、前記第2のヌクレオチドを含む溶液を混合し、微粒子を用いて前記溶液を攪拌しながらハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、上記方法。

【請求項2】 前記微粒子がビーズであることを特徴とする、請求項1記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項3】 前記微粒子の直径が0.01 μ m以上10 μ m以下であることを特徴とする、請求項1記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項4】 前記微粒子の表面が親水基によって被覆されていることを特徴とする、請求項1記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項5】 前記微粒子の比重が前記溶液より高いことを特徴とする、請求項1記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項6】 前記微粒子が磁気微粒子であることを特徴とする、請求項1記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項7】 前記基盤を回転させることによって前記攪拌を行うことを特徴とする、請求項1記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項8】 前記微粒子が溶液内で前記回転の回転中心方向への移動及び回転中心とは逆の方向への移動をすることによって前記攪拌を行うことを特徴とする、請求項7記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項9】 前記基盤を振動させることによって前記攪拌を行うことを特徴とする、請求項1記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項10】 スターを用いて磁気微粒子を回転させることによって前記攪拌を行うことを特徴とする、請求項6記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項11】 前記混合の後、前記溶液をとじこめるために前記基盤上にカバー材をのせてシールドし、前記シールドした基盤を回転及び／または振動させることによって、前記溶液を攪拌することを特徴とする、請求項1記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項12】 第1のヌクレオチドが固定化された基盤と、前記基盤と、前記第1のヌクレオチドと相補的な第2のヌクレオチドと、微粒子とを含む溶液とを保持するための容器と、前記容器を回転させるための回転機構とを有することを特徴とするハイブリダイゼーション装置。

【請求項13】 前記回転機構による回転の回転方向及び回転速度を制御するための制御機構とを有することを特徴とする、請求項12記載のハイブリダイゼーション

装置。

【請求項14】 前記回転速度は1rpm以上60rpm以下に制御されることを特徴とする、請求項12記載のハイブリダイゼーション装置。

【請求項15】 前記装置には、更に容器内の湿度を制御する手段を備えていることを特徴とする、請求項12記載のハイブリダイゼーション装置。

【請求項16】 前記装置には、更に容器内の温度を制御する手段を備えていることを特徴とする、請求項12記載のハイブリダイゼーション装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来の技術】DNAチップは、ガラス基盤上に数千～数万の遺伝子DNAを高密度に配列・固定したデバイスである。表面を特殊加工したスライドガラスなどの固相基盤上に複数の異なるDNAプローブを高密度に固定する。DNAチップに対して、細胞や組織から抽出したmRNAから逆転写反応により蛍光標識した試料を滴下し、ハイブリダイゼーションを行うことで、多数の遺伝子の発現情報を大規模に同時並行で解析できる。ヒトゲノム計画の進展に伴い、遺伝子を個々として捉えるのではなく、ゲノム中に存在する全ての遺伝子の機能とネットワークを網羅的に解明することに主眼が置かれるようになってきた。

【0002】医薬品の作用をDNAチップによって解析する道も開かれてきた。免疫抑制剤FK506の作用メカニズムは既に詳しく解析されており、FK506はFK結合タンパク質(FK-binding protein;FKBP)に結合し、FKBPのcalcineurin(CN)活性化を阻害する。その結果、転写因子NFATの活性化が阻害されてリンパ球の活性化が抑制されることがわかっている。Martonらは酵母の全遺伝子に近い6000余のcDNAを固定したDNAチップを用いて、この作用点について解析した。その結果、FK506の作用により、36遺伝子(約0.6%)が2倍以上の変動を示した。その変動プロファイルは、野生株とCN欠損株の遺伝子発現プロファイルの差異に酷似していた。この成果について、マートンらがネイチャー・メディシン第4号(2000年)第1293頁から第1301頁(Marton MJ et al., Nature Medicine, 4, (1999), 1293-1301)に報告している。

【0003】また、DNAチップを用いた癌細胞の遺伝子発現プロファイルから、新しい分類により患者の予後を推定できることが示された。アリザドらは18000クローンのcDNAを固定したDNAチップを作製し、びまん性大細胞性リンパ腫(diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL)患者の癌細胞における遺伝子発現を解析した。その結果、患者は2群に分けられ、一方は胚中心B細胞の遺伝子発現によく似た発現プロファイルを示し、他方は末梢血を活性化したB細胞によく似た発現プロファイルを示した。しかも、前者は後者よりも生存率が明らかに良好であった。このような分類は既存の病理学的診断では行え

なかったことである。これらの成果についてはアリザドラがネイチャー第403号(2000)第503頁から第511頁 (Alizadeh AA et al., Nature, 403, (2000), 503-511)に報告している。以上のような状況のもと、包括的遺伝子発現モニタリング法として、DNAチップ技術に対する期待が高まっている。

【0004】DNAチップの代表的なものとして、アフィメトリックス社のDNAチップがある。アフィメトリックス社のDNAチップは固相でDNAプローブを合成するため、プローブ長を高々25 mer までしか伸長できない。従って蛍光検出感度が、スポットタイプのDNAチップと比較して低い。これを克服するために、アフィメトリックス社の実験プロトコルでは、ハイブリダイゼーションにおいて毎分60回の速度でDNAチップを回転させている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】DNAチップによる計測のメリットは数千から数万の遺伝子の発現状態を同時に解析可能な点である。一方、デメリットとして、他の遺伝子発現解析技術であるノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、ボディマップ法と比較して、データの再現性・定量性が低いという点が挙げられる。DNAチップの再現性・定量性が低い原因の一つとして、投与したターゲットDNAのハイブリダイゼーションの効率が低いという問題を挙げることができる。ハイブリダイゼーションの効率が低い場合、特に発現量の少ない遺伝子については、検出される蛍光強度が微弱となり、データの定量性・再現性は著しく低下する。

【0006】以下にDNAチップにおけるハイブリダイゼーションの効率を計算する。一般に水溶液中でのmRNAの拡散定数は $D = 10 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ 程度であることについて、ポリッツらが米科学アカデミー紀要第95号(1998年)第6043頁から第6048頁 (Politz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) pp6043-6048)に報告している。また、DNAチップを用いた解析におけるハイブリダイゼーションに要する時間は一般的に6時間程度であるので、溶液中のターゲットDNAがスライドガラス表面上で、ハイブリダイゼーション中に移動可能な距離は、

$$\text{【数1】} \langle r^2 \rangle^{1/2} = \langle x^2 + y^2 \rangle^{1/2} = 4Dt^{1/2} = (4 \times 10 \times 60 \times 60 \times 6)^{1/2} = 929 [\mu\text{m}]$$

となる。これはあるターゲットDNA分子がハイブリダイゼーション時間中にある位置から平均して $r = 929 \mu\text{m}$ しか移動できないことを意味する。一方、スライドガラス上で $24 \times 50 \text{ mm}$ 程度のカバーガラスを用いて、ターゲットDNA溶液を押し広げることでハイブリダイゼーションを行う。従って、ターゲットDNAがガラス上の相補的なプローブDNAに全てハイブリダイズすると仮定した場合でも、投与した全ターゲットDNAに対して、DNAチップ上の1つのスポットにおいてハイブリダイゼーションに寄与するターゲットDNAの割合は、

$$\text{【数2】} \pi r^2 / (22 \times 50) = \pi (0.929)^2 / (22 \times 50) = 2.2 \times 10^{-3}$$

となる。これは、ターゲットDNA溶液内の高々0.2%しかハイブリダイゼーションに寄与していないことを示す。

【0007】また、DNAチップは、cDNAあるいは合成したオリゴヌクレオチドをスポットするものと、基盤上でリソグラフィーを用いて固相合成するものの2種類に大別することが可能である。後者のDNAチップはアフィメトリックス社により製造されるものであるが、基盤上で固相合成のため作成可能なオリゴヌクレオチドの長さは25 mer が限界とされている。しかし、25 mer のオリゴヌクレオチドは300mer 以上の長さを持つ cDNA のDNAプローブと比較すると、ハイブリダイゼーションの効率が極端に低下する。これについて、増保が『DNAチップと最新PCR法』(秀潤社)第7頁から12頁において報告している。これを改善するために、アフィメトリックス社の実験プロトコルでは、サンプルcDNAをT7 RNAポリメラーゼによりcRNAとして増幅し、更にハイブリダイゼーションにおいて毎分60回の速度でDNAチップを回転させている。しかし、上述したプロトコルを用いた場合でも、発現量が低い遺伝子については3倍以上のばらつきがみられ、出芽酵母遺伝子の2割について遺伝子発現量の測定が困難であることについて、村上らが『現代化学』(東京化学同人)(2000年7月号)第60頁から68頁において報告している。従って、DNAチップによる計測におけるハイブリダイゼーションの効率の低さは、大きな課題の一つとなっている。

【0008】本発明の目的は、従来技術の限界である高々0.2%のハイブリダイゼーション効率を高め、定量性・再現性の高い信号を得ることのできる、安価かつ簡易で汎用性のあるハイブリダイゼーション方法および装置を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明のハイブリダイゼーション方法および装置は、上記目的を達成するため、微粒子と、試料と、前記微粒子と前記試料を含む流体を保持する容器と、前記容器を複数固定する手段と、前記容器の湿度を制御する手段と、前記容器の温度を一定に保つ手段と、前記容器を回転させる手段を有する。

【0010】すなわち本発明は以下の(1)～(16)を提供する。

(1) 第1のヌクレオチドと前記第1のヌクレオチドと相補的な第2のヌクレオチドとのハイブリダイゼーション方法であって、前記第1のヌクレオチドが固定化された基盤に対し、前記第2のヌクレオチドを含む溶液を混合し、微粒子を用いて前記溶液を攪拌しながらハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、上記方法。

(2) 前記微粒子がビーズであることを特徴とする、上記(1)記載のハイブリダイゼーション方法。

(3) 前記微粒子の直径が0.01 μm 以上10 μm 以下であることを特徴とする、上記(1)記載のハイブリダイゼーション方法。

【0011】(4) 前記微粒子の表面が親水基によって被覆されていることを特徴とする、上記(1)記載のハイブリダイゼーション方法。

(5) 前記微粒子の比重が前記溶液より高いことを特徴とする、上記(1)記載のハイブリダイゼーション方法。

(6) 前記微粒子が磁気微粒子であることを特徴とする、上記(1)記載のハイブリダイゼーション方法。

【0012】(7) 前記基盤を回転させることによって前記攪拌を行うことを特徴とする、上記(1)記載のハイブリダイゼーション方法。

(8) 前記微粒子が溶液内で前記回転の回転中心方向への移動及び回転中心とは逆の方向への移動をすることによって前記攪拌を行うことを特徴とする、上記(7)記載のハイブリダイゼーション方法。

(9) 前記基盤を振動させることによって前記攪拌を行うことを特徴とする、上記(1)記載のハイブリダイゼーション方法。

【0013】(10) スターラを用いて磁気微粒子を回転させることによって前記攪拌を行うことを特徴とする、上記(6)記載のハイブリダイゼーション方法。

(11) 前記混合の後、前記溶液をとじこめるために前記基盤上にカバー材をのせてシールドし、前記シールドした基盤を回転及び／または振動させることによって、前記溶液を攪拌することを特徴とする、上記(1)記載のハイブリダイゼーション方法。

(12) 第1のヌクレオチドが固定化された基盤と、前記基盤と、前記第1のヌクレオチドと相補的な第2のヌクレオチドと、微粒子とを含む溶液とを保持するための容器と、前記容器を回転させるための回転機構とを有することを特徴とするハイブリダイゼーション装置。

【0014】(13) 前記回転機構による回転の回転方向及び回転速度を制御するための制御機構とを有することを特徴とする、上記(12)記載のハイブリダイゼーション装置。

(14) 前記回転速度は1 rpm以上60 rpm以下に制御されることを特徴とする、上記(12)記載のハイブリダイゼーション装置。

(15) 前記装置には、更に容器内の湿度を制御する手段を備えていることを特徴とする、上記(12)記載のハイブリダイゼーション装置。

(16) 前記装置には、更に容器内の温度を制御する手段を備えていることを特徴とする、上記(12)記載のハイブリダイゼーション装置。

【0015】以下、本発明の構成についてより具体的に説明する。

1) DNAチップの構成

蛍光標識されたターゲットDNAを含むサンプル内に微粒子を混入させ、ピペッティングによりサンプルチューブ内で微粒子を分散させる。ターゲットDNAをDNAチップ上に滴下し、カバーガラスを被せ、DNAチップ上のハイブリダイゼーションを行う領域にターゲットDNAを押し広げる。シール剤を用いてDNAチップに対してターゲットDNAを固定する。ターゲットDNA及び微粒子をカバーガラスとDNAチップにより挟み、これをシール剤で固定する。

【0016】微粒子を使う方法について、具体的な性質および数値を以下に述べる。微粒子の表面はカルボキシル基、ヒドロキシル基などの親水基で被覆されていることが好ましい。これにより、微粒子とターゲットDNAの非特異的な吸着を防ぎ、ハイブリダイゼーションに寄与するターゲットDNAの量を低減させることなく、効率よくハイブリダイゼーションを行える。また、微粒子の組成は特に限定されず、市販のビーズ等を好適に使用することができる。特に好適に使用されるものとして磁気ビーズが挙げられる。ポリスチレンビーズでも効果があることが実験で確認されており、金微粒子等の金属粉末でも、ほぼ同様の効果が得られる。

【0017】微粒子の直径として、約0.01 ~10 μm の範囲のものが使用可能であり、4~10 μm の範囲が好ましい。その中でもっとも効果が高かったのは直径10 μm の微粒子である。ここで、DNAチップとカバーガラスで形成される間隙は約20 μm であるため、直径が大きくなりすぎると動きが制限されてしまうため、あまり好ましくない。水の比重と比較して、微粒子の比重は大きいものが望ましい。使用可能な微粒子の比重は、1~20、好ましくは1.05~19.3、最も好ましくは約1.5 g/cm^3 である。また、微粒子の濃度としては1 μl 当たり数万個程度で用いることが好適である。スライドの設置位置は、回転方向の面内に対して垂直方向よりも水平方向が効果的である。

【0018】2) ハイブリダイゼーション装置について
ハイブリダイゼーションインキュベータ(攪拌装置)は、DNAチップを保持するハイブリダイゼーションチャンバを保持できる1または複数の保持軸と、保持軸を回転させる回転軸より構成される。保持軸および回転軸はそれぞれ独立に回転することが可能である。回転軸の回転速度は任意に設定可能である。また、時間に対して回転速度を一定、あるいは可変に設定することが可能である。プログラムにより回転速度を時々刻々制御することも可能である。また、回転の方向も任意に設定できる。

【0019】ハイブリダイゼーションの際の温度は、通常ハイブリダイゼーションにおいて使用する温度範囲内で任意に設定し得る。またハイブリダイゼーションに至適な温度として設定した温度に対して、 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ の精度で一定に保つことが可能な温度制御手段を設けることができる。

【0020】容器の回転速度としては1～60 rpm まで可能である。もっとも高いハイブリダイゼーション効率を行えるのは60 rpm である。回転速度をプログラムにより変化させたり、一定時間毎に回転方向を反転させることでより効果的な攪拌効果を得られると考える。

【0021】具体的には、逆転写反応により蛍光標識されたターゲットDNAを作成し、95℃、2分の熱変性によるプレハイブリダイゼーションを行う。その後、ターゲットDNAを含むハイブリダイゼーション溶液に対して、微粒子を混ぜ、DNAチップに滴下する。カバーガラスを被せ、シール剤でハイブリダイゼーション溶液をDNAチップに対して固定する。ハイブリダイゼーションインキュベータ内でハイブリダイゼーションチャンバにDNAチップを固定、密封する。そして、ハイブリダイゼーションチャンバをハイブリダイゼーションインキュベータ内の保持軸に固定し、保持軸の回転を開始する。ハイブリダイゼーションチャンバはDNAチップ上のハイブリダイゼーション溶液の蒸発を防止するため、3×SSCを含んだ保湿剤を含む。ハイブリダイゼーションインキュベータは至適の温度でハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションインキュベータはハイブリダイゼーションチャンバを複数固定可能であり、それぞれのチャンバを回転させる回転軸を持つ。回転時、ハイブリダイゼーション溶液内の微粒子は重力方向に絶えず落下し続けるため、ターゲットDNAを攪拌する効果を持つ。結果として、ハイブリダイゼーション溶液中のターゲットDNAと、スライドガラス上に固定されたDNAプローブのハイブリダイゼーションの効率を高めることができる。尚、これら全体の工程を示すフローチャートを図8に示す。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明のハイブリダイゼーション方法および装置の第一の実施例について図1、2、3、4を用いて説明する。図1のハイブリダイゼーション溶液107内は、蛍光標識され、精製を経て、熱変性を完了したターゲットDNA103を含む。ハイブリダイゼーション溶液107に微粒子104を混入させ、サンプルチューブ102内でビベティングを行い、ハイブリダイゼーション溶液107中で微粒子104を均一に分散させる。なお、微粒子104は表面にカルボキシル基を有しているため、ターゲットDNA103と非特異的に吸着しないという特性を持つ。従って、プローブDNAに対するターゲットDNA103のハイブリダイゼーションの量は減少しない。

【0023】次に、ハイブリダイゼーション溶液107をDNAチップ101に滴下し、カバーガラス105を被せ、DNAチップ上のハイブリダイゼーションを行う領域にハイブリダイゼーション溶液107を押し広げる。シール剤106を用いてカバーガラス105下のハイブリダイゼーション溶液107をDNAチップ101に対して

固定する。

【0024】図2を用いてハイブリダイゼーションチャンバ201へのDNAチップ203の固定法について説明する。ハイブリダイゼーションチャンバ201にはDNAチップ203上のハイブリダイゼーション溶液の乾燥を防止するため、3×SSC (Standard Sodium Citrate) を含む保湿剤202が付加されている。ハイブリダイゼーションチャンバ201に蓋205を付加することにより、ハイブリダイゼーションチャンバ201内の湿度を飽和蒸気圧に保ち、ハイブリダイゼーション溶液の乾燥を防止できる。また、ハイブリダイゼーションチャンバ201は後述する回転状態においてもDNAチップ203を強固に保持できる。尚、206はストッパーであるが、チャンバ内におけるDNAチップの固定方法は特に限定されるものではない。

【0025】図3を用いて、ハイブリダイゼーションの効率を向上させる方法および装置について説明する。本装置は、温度を一定に保つハイブリダイゼーションインキュベータ304、ハイブリダイゼーションチャンバ303を固定する保持軸302、保持軸302を回転させる回転軸301から構成される。回転軸301および保持軸302は、矢印311、矢印312の方向にそれぞれ独立に回転できる。

【0026】また、ハイブリダイゼーションインキュベータ304は、プログラムにより任意の時刻における回転軸301および保持軸302の回転数および回転方向をそれぞれ独立に、任意に設定できる。また、保持軸302は複数のハイブリダイゼーションチャンバ303を同時に保持できる。また、ハイブリダイゼーションチャンバ303は円形の形状を持つので、回転軸301の回転方向に対してDNAチップを垂直あるいは平行といった任意の方向に保持できる。

【0027】図3においてはDNAチップ306を回転軸301の回転方向に対して水平に配置した例について説明する。DNAチップ306上において、ハイブリダイゼーション溶液がカバーガラス305とシール剤308により密封された状態でハイブリダイゼーションが進行している。DNAチップ306を保持したハイブリダイゼーションチャンバ303は回転軸301を中心として矢印の方向に毎秒60回転の速度で回転している。DNAチップ306、310に保持されたハイブリダイゼーション溶液中には微粒子307、309が含まれている。微粒子307、309はいずれの回転状態においても重力方向へ落下する。従って、微粒子307、309は、移動する領域のハイブリダイゼーション溶液を体積分排除し、ハイブリダイゼーション溶液を攪拌する効果を持つ。DNAチップ306を静置する場合と比較して、ハイブリダイゼーション溶液中のDNAターゲットの拡散距離が増加するため、ハイブリダイゼーションの効率が上昇する。従って、得られる信号が増加し、DNAチップ計測におけ

る再現性・定量性を向上させるという効果をもたらす。
【0028】上記の例では回転軸の回転のみについて説明したが、更に保持軸の回転も同時に加えることにより、更にハイブリダイゼーションの効率を上昇させることが可能である。

【0029】図4を用いて、上記図3とは異なる回転方法について説明する。同様にハイブリダイゼーションインキュベータ405はハイブリダイゼーション温度を至適の温度に精度よく保つ。ハイブリダイゼーションインキュベータ405内にはロータ401が並列に配置されており、一方向に回転できる(402)。ロータ401上にハイブリダイゼーションチャンバ404を接地させると、ハイブリダイゼーションチャンバ404は一方向に回転する。ハイブリダイゼーションチャンバ404内に保持されたDNAチップ403内には前述したようにターゲットDNA内に微粒子を保持している。微粒子は重力方向に落下し、ターゲットDNAを攪拌するため、ハイブリダイゼーション効率が増加する。

【0030】また、ロータ401を矢印406で示されるようにシーソー状に移動させることも、ハイブリダイゼーションの効率を更に上昇させる。また、ロータ401に振動を加えることも可能であり、ハイブリダイゼーションの効率を更に上昇させる。ロータ401の回転速度、回転方向、シーソー状の振幅距離、振幅速度および振動は任意の時間に任意の状態に設定することが可能である。

【0031】図5に磁気微粒子をスターラにより回転させ、ハイブリダイゼーション効率を増加させる方法について説明する。上述した方法によりDNAチップ上のターゲットDNA内には既に磁気微粒子503が分散されている。磁気微粒子503がDNAチップ502表面で回転すると、磁気微粒子503がDNAプローブと接触し、DNAプローブの剥がれおよび効率の良いハイブリダイゼーションの阻害などの問題が発生する。これらの問題を回避するために、本実施例では、DNAチップ502のカバーガラス面を下にした状態でスターラ501と接地させる。

【0032】磁気微粒子503はカバーガラス表面に落下し、微小なスターラ回転子として、回転をする。ターゲットDNA溶液が効率よく攪拌するため、ハイブリダイゼーションの効率を増加させる。

【0033】図6に対流によりハイブリダイゼーションの効率を増加させる方法について説明する。高熱源601上にターゲットDNAをシールされた状態のDNAチップ603を接地させる。次にDNAチップ603の上面にペルチェ素子などの低熱源602を接地させる。DNAチップの上面と下面に温度差が生じ、ターゲットDNAの対流が発生する。ターゲットDNA溶液が効率よく攪拌するため、ハイブリダイゼーションの効率を増加させる。

【0034】図7に、従来方法と上述した新規方法によるハイブリダイゼーションの実験結果の一例を示す。実

験はサンプルとしてIFI 56(インターフェロン誘導性タンパク質56の遺伝子)を用い、以下の組成のバッファー中で62℃、6時間のハイブリダイゼーションを行った。

【0035】

バッファー組成	3.4×SSC
	0.3% SDS
	50pg/ μ l DNA
	4×10 ⁷ ビーズ/ml

【0036】図7の縦軸は蛍光強度を示す。従来方法と比較して、本方法では5倍の蛍光強度を得ることができ、なお、エラーバーはスポット数20の信号の標準偏差である。

【0037】

【発明の効果】以上詳述したように本発明を用いることによって、DNAチップ上のターゲットDNAを攪拌し、ハイブリダイゼーションの効率を増加させることができ、ターゲットDNAの検出感度を増加させることができ、またハイブリダイゼーション時間を短縮することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】ハイブリダイゼーション溶液のDNAチップに対する固定の一例を示す。

【図2】ハイブリダイゼーションチャンバへのDNAチップの固定法の一例を示す。

【図3】本発明のハイブリダイゼーション装置の一例を示す。

【図4】異なる回転方法を用いた本発明のハイブリダイゼーション装置の一例を示す。

【図5】スターラによる磁気微粒子の回転を用いた本発明のハイブリダイゼーション方法を示す。

【図6】対流によるハイブリダイゼーションの効率を増加させる方法を示す。

【図7】従来方法と本発明のハイブリダイゼーション方法による実験結果の一例を示す。

【図8】全体の工程を示すフローチャートを示す。

【符号の説明】

101…DNAチップ、102…サンプルチューブ、103…ターゲットDNA、104…微粒子、105…カバーガラス、106…シール剤、107…ハイブリダイゼーション溶液、201…ハイブリダイゼーションチャンバ、202、204…保湿剤、203…DNAチップ、205…蓋、206…ストッパー、301…回転軸、302…保持軸、303…ハイブリダイゼーションチャンバ、304…ハイブリダイゼーションインキュベータ、305…カバーガラス、306、310…DNAチップ、307、309…微粒子、308…シール剤、311…回転軸の回転方向、312…保持軸の回転方向、401…ロータ、402…ロータの回転方向、403…DNAチップ、404…ハイブリダイゼーションチャン

バ、405…ハイブリダイゼーションインキュベータ、
406…シーソの振動方向
501…スターラ、502…DNAチップ、503…磁気

微粒子、601…高熱源、602…低熱源、603…DNA
Aチップ

【図1】

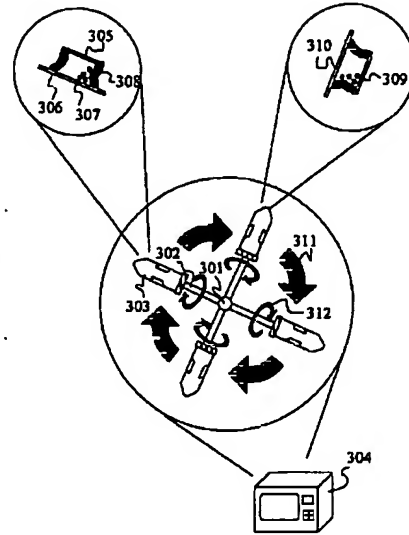
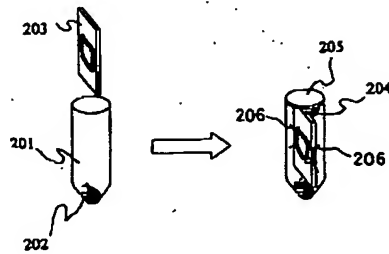
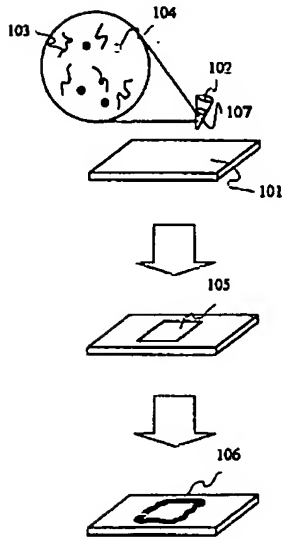
【図2】

【図3】

図1

図2

図3



【図4】

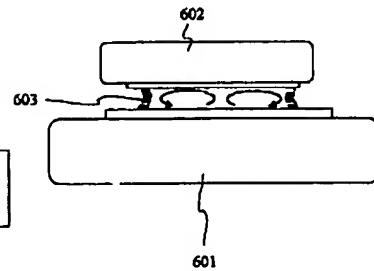
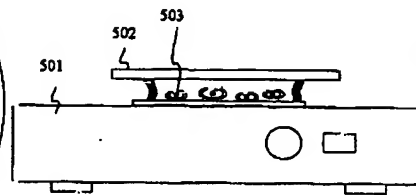
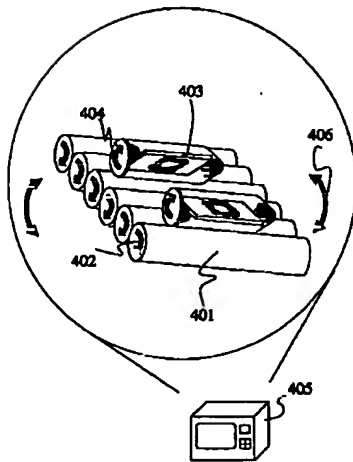
【図5】

【図6】

図4

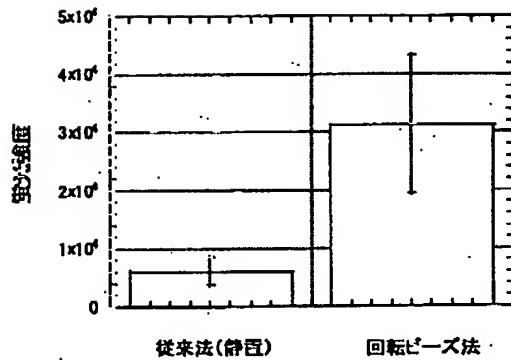
図5

図6



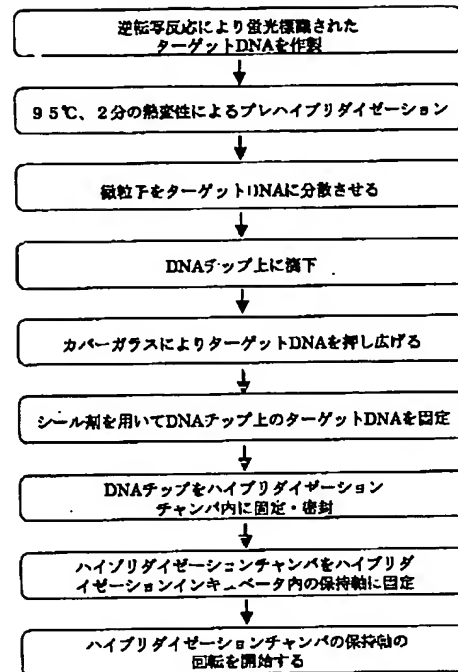
【図7】

図7



【図8】

図8



フロントページの続き

(72)発明者 斎藤 俊郎
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
株式会社日立製作所ライフサイエンス推進
事業部内

(72)発明者 富田 裕之
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
株式会社日立製作所ライフサイエンス推進
事業部内

(72)発明者 奈良原 正俊
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
株式会社日立製作所ライフサイエンス推進
事業部内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 HA14
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15
4B063 QA01 QQ79 QR32 QR55 QR66
QR82 QS34 QS36 QX02